Cryptogamie, Mycol. 1987, 8 (4) : 269-288

REMARQUES À PROPOS DE L'ULTRASTRUCTURE D'ASCOSPORES « ALBINOS » OU « GRANULEUSES » DE MUTANTS D'*ASCOBOLUS IMMERSUS* PERS. (gène b8).

par L.M. MELENDEZ-HOWELL*, A. BELLEMÈRE** et J.-L. ROSSIGNOL***

RÉSUMÉ — Les ascospores du mutant albinos (gène b8) de l'*Ascobolus immersus* outre leur défaut de pigmentation présentent certains caractères ultrastructuraux du mutant granuleux (sur le même gène) en particulier une périspore interne discontinue se limitant à des loupes. Une modification du métabolisme lipidique associée à la perturbation de certains échanges entre l'ascospore en développement et l'épiplasme de l'asque paraît accompagner l'absence de pigmentation des albinos.

SUMMARY — In *Ascobolus immersus* the non pigmented ascospores of the albino mutant (b8 gene) show some ultrastructural characters of the granular mutant (on the same gene) specially a discontinuous internal perispore restricted to a few lens. The absence pigmentation albino mutant spores is probably associated to a modification of lipid metabolism in connection with perturbations of the exchanges between the developing ascospore and the ascus epiplasm.

MOTS CLÉS : *Ascobolus*, ascospores, mutants, pigmentation, lipides.

* UA 257, CNRS, Laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle, 12, rue Buffon, F 75005 Paris, France.

** Laboratoire de Mycologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon (Services de Saint-Cloud), Grille d'Honneur, Parc de Saint-Cloud, F 92211 Saint-Cloud Cedex, France.

*** Laboratoire IMG, Bâtiment 400, Université Paris-Sud, F 91405 ORSAY Cedex, France.

Chez le champignon Ascomycète hétérothallique *Ascobolus immersus* 19 gènes contrôlent la couleur de l'ascopore (NICOLAS & al., 1981). L'examen ultrastructural du développement des ascospores chez deux mutants (gène b_8) de l'*Ascobolus immersus* l'un à ascospores albinos (b_8) et l'autre à ascospores granuleuses (b_8-g) fait suite à une étude de la souche sauvage et de deux mutants (gène b_2), l'un à ascospores « albinos » et l'autre à ascospores « ceinturées » publiée antérieurement (BELLEMÈRE & al., 1981). Les techniques mises en œuvre, les définitions des divers constituants morphologiques, de la paroi ascosporale, et celle des principaux stades de leur développement utilisées ici ont été indiquées dans cette précédente publication.

RÉSULTATS

I - Les ascospores du mutant albinos (gène b_8) (Pl.I à IV ; Fig.1 A_1 à G_1).

Dans ses grandes lignes, le développement des ascospores de ce mutant est analogue à celui de la souche sauvage et des mutants sur le gène b_2. Il présente cependant quelques caractères originaux et remarquables qui seront analysés successivement.

1. Les loupes de la périspore.

L'essentiel de la périspore, Patag +, qui correspond à la périspore moyenne de la souche sauvage contient dans sa partie la plus profonde des portions Patag – (appelées ici loupes) en forme de lentille plan-convexe dont la face saillante est dirigée vers l'extérieur. Ces lentilles n'existent pas encore au tout début du développement de la paroi ascoporale (Pl.I-B ; Fig. $1A_1$). Au plus jeune stade où on les observe elles sont nettement hémisphériques (Pl.I-C ; Fig. $1B_1$). Chaque spore n'en contient que quelques-unes. La base plane de ces loupes est séparée de la paroi intermédiaire de la spore par une très mince couche (cs), plus dense et un peu plus réactive que le reste de la périspore (Pl.I-C, E ; Fig. $1B_1$). Au contact de la face convexe de chaque loupe, le contenu de celle-ci devient très clair, formant une très mince zone externe (ze), finement irrégulière, bien distincte (Pl.I-C ; Fig. $1B_1$). A un stade un peu plus âgé (Pl.II-A ; Fig. $1C_1$), une masse interne (mi) subsphérique, d'aspect plus foncé, se forme dans la loupe tandis que la mince couche basale sombre est un peu moins réactive. Plus tard, cette masse interne envahit la majeure partie de la loupe (Pl.II-C, D, Pl.III-B ; Fig. $1D_1$, E_1). La substance fondamentale originelle (so) de celle-ci se réduit désormais à des lambeaux périphériques dont la texture est plus ou moins irrégulièrement vésiculeuse. L'étroite zone claire (ze) qui borde la loupe vers l'extérieur s'épaissit un peu ; on y discerne de fins trabécules radiaires mettant en relation la partie interne de la loupe avec la périspore. Quand la spore est mûre (PL.IV-A ; Fig. $1F_1$, G_1), la masse interne de la loupe est devenue plus réactive ainsi que les lambeaux de la substance originelle ; sous la loupe, la mince bande de périspore (cs) est maintenant revêtue d'une étroite couche claire qui fait suite vers l'intérieur à cette zone externe transparente de la loupe. La zone externe claire de la loupe s'est épaissie aux endroits où persistent des lambeaux (la) de la substance originelle de la loupe. Elle vient plus ou moins faire saillie dans la périspore et les loupes paraissent ainsi un peu boursouflées.

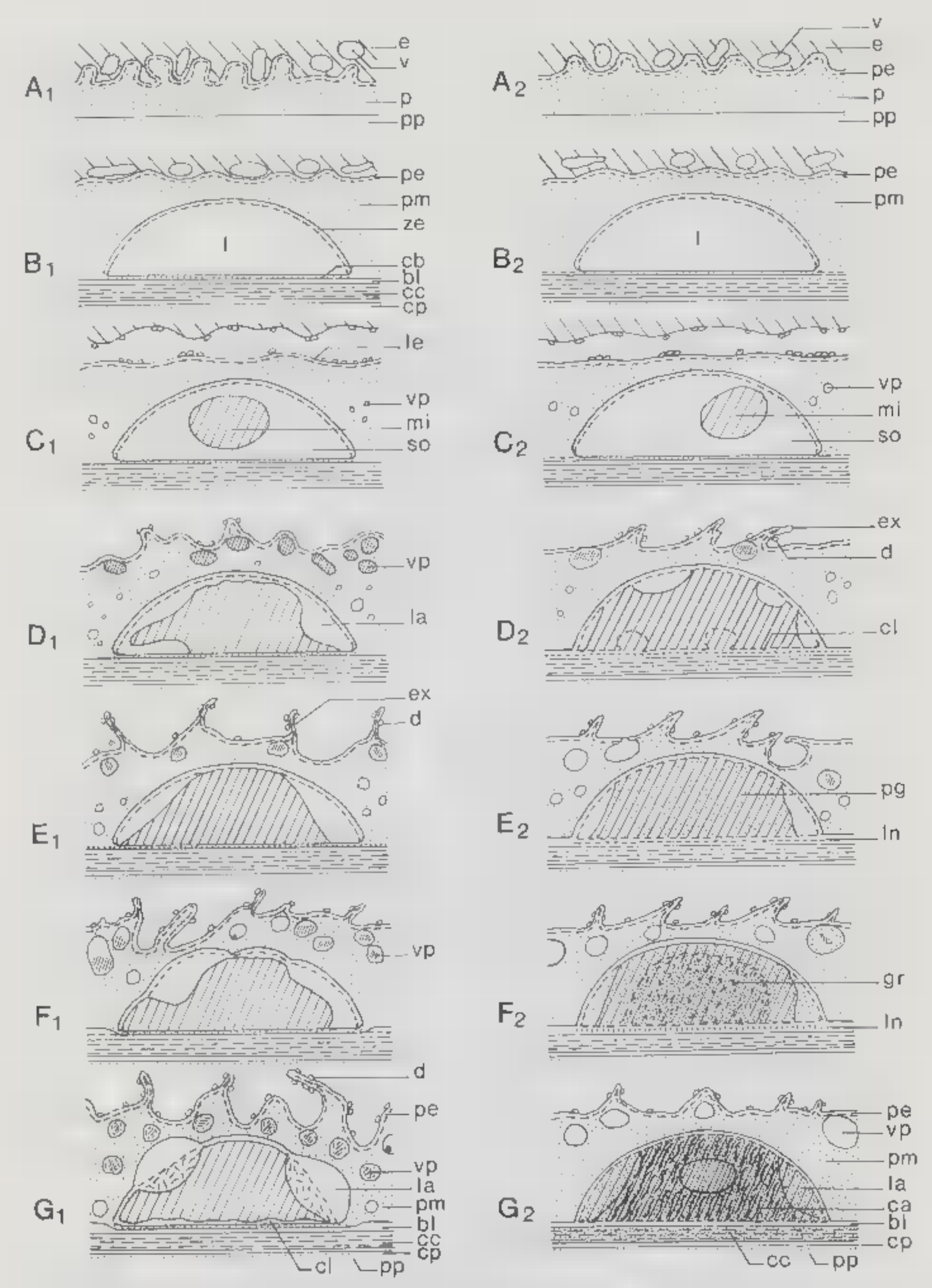


Fig. 1 — *Abscobolus immersus*. Schémas du développement des loupes de la périspore chez deux mutants du gène bB, l'un albinos (A1 à G1) et l'autre granuleux (A2 à G2). Voir le texte.

Fig. 1 — *Abscobolus immersus*. Schemes of the development of perispore lens in two mutants of bB gene ; one is albino (A1 to G1), the other is granular (A2 to G2). See the text.

2. Les vésicules de la périspore.

Outre les loupes, la périspore contient aussi, à certains stades, de nombreuses vésicules subglobuleuses de tailles diverses et d'aspect clair (PL.II-C ; Fig. 1D$_1$). Ces vésicules n'apparaissent pas avant qu'une masse interne ne se soit formée à l'intérieur de chacune des loupes (Pl.II-A). Au début, elles sont toutes de petite taille et leur contenu est transparent (Pl.II-B ; Fig. 1C$_1$).

Ultérieurement, à la périphérie de la spore, on observe aussi de grosses vésicules à contenu légèrement réactif (PL.II-C, III-D, IV ; Fig. 1D$_1$ à G$_1$).

Ceci porterait à croire que les petites vésicules naissent dans la partie profonde de la périspore, se déplacent de façon centrifuge en s'accroissant sans doute par fusion. Des figures semblent indiquer que certaines grosses vésicules peuvent confluer avec la limitante externe de la spore et libérer leur contenu à l'extérieur (Pl.III-D).

Il est remarquable que, dans les spores âgées, la structure de ces grosses vésicules soit analogue à celle des loupes (Pl.IV-A à D ; Fig. 1G$_1$).

3. La surface externe de la spore.

La surface de la très jeune ascospore montre des ondulations assez profondes, relativement étroites et régulières (Pl.I-A ; Fig. 1A$_1$). Rapidement celles-ci s'atténuent très nettement (Pl.I-B, C ; Fig. 1B$_1$). Quand des vésicules sont présentes dans la périspore (PL.II-C), des dépôts localisés et réactifs viennent se plaquer sur la spore ainsi que sur la surface interne de l'épiplasme (Pl.III-C). La surface de la spore devient ensuite irrégulière (Pl.II-D, III-D ; Fig. 1D$_1$ à F$_1$) : elle forme des extrusions étroites et minces. Recouvertes de dépôts réactifs en forme de gouttelettes, celles-ci ont un aspect caractéristique qui rappelle celui d'un chapelet de saucisses (Pl.IV-D ; Fig.1G$_1$).

4. La structure de la paroi intermédiaire de l'ascospore.

Elle est toujours complexe et d'analyse difficile en raison de sa minceur et d'artéfacts résultants de défauts, même minimes, de l'orthogonalité des coupes. On a vu plus haut que sous les jeunes loupes existe une mince couche basale de périspore nettement plus réactive (Pl.I-C, E ; Fig. 1B$_1$). Sous celle-ci, une mince couche blanche est assez bien marquée (Pl.I-C) à l'extérieur d'une couche castor faiblement réactive au début.

Quand une masse interne sombre se développe dans les loupes, la partie la plus interne de la périspore devient plus réactive sur toute l'étendue de la spore et non pas seulement sous la base des loupes (Pl.III-A ; Fig. 1E$_1$). Puis, ultérieurement, cette mince couche réactive disparaît (Fig. 1F$_1$) ; en dehors des loupes, la couche blanche devient plus épaisse et elle est clivée par une très mince lamelle réactive (Pl.III-B ; Fig. 1F$_1$) qui est d'ailleurs transitoire (Pl.IV-B ; Fig. 1G$_1$).

5. Les globules lipidiques du sporoplasme.

Ces globules lipidiques, qui sont toujours relativement abondants, sont surtout remarquables dans les jeunes ascospores encore dépourvues de loupes (Pl.I-B, D). A ce stade, en effet, certains d'entre eux paraissent entourés d'une mince zone claire d'épaisseur irrégulière bordée d'une membrane comme s'ils étaient contenus dans un compartiment de séquestration.

Dans les ascospores mûres (Pl.IV-E), les globules lipidiques ont un aspect banal ; ils sont légèrement plus réactifs au test de Patag vers l'extérieur et contiennent quelques grains plus opaques aux électrons.

On sait que les ascospores des mutants albinos (gène b_2) diffèrent des ascospores sauvages non seulement par l'absence de pigmentation de la partie la plus profonde de la périspore (périspore interne) mais, de plus, par la structure de la surface sporale, de la périspore moyenne, de la paroi intermédiaire et des globules lipidiques du sporoplasme (BELLEMÈRE & al., 1981).

Les ascospores du mutant albinos (gène b_8), elles aussi dépourvues de pigment, diffèrent cependant des ascospores précédentes.

— Tout d'abord, leur périspore interne ne forme pas une couche continue, mais est réduite à des loupes séparées, ce qui est inattendu.

— De plus, leur surface est beaucoup plus irrégulière, avec des extrusions importantes.

— Leur paroi intermédiaire ne présente pas de lamelle noire permanente et leur périspore moyenne ne contient pas de granules Patag +.

— Enfin, les globules lipidiques de leur sporoplasme n'ont pas l'aspect caractéristique « en passoire » de ceux de l'albinos b_2.

L'étude d'un autre mutant de ce gène b_8 (mutant granuleux) permet d'apporter quelques éclaircissements à propos de ces modifications structurales.

II - Les ascospores du mutant granuleux (gène b_8) (Pl.V à VIII ; Fig.1 A_2 à G_2).

Seules certaines parties de la surface de ces ascospores sont pigmentées, ce qui leur confère un aspect granuleux au microscope photonique.

Dans ses grandes lignes, le développement de ces ascospores est analogue à celui des ascospores du mutant albinos (gène b_8). Toutefois, en fin de maturation, un dépôt pigmentaire se forme dans la paroi sporale. On n'envisagera ici que les points remarquables de ce développement.

1. Les loupes de la périspore.

Chez les ascospores du mutant granuleux (gène b_8), la périspore comporte des loupes dont la structure et le développement sont analogues à ceux décrits plus haut chez le mutant albinos (Pl.V-B, D, F ; VI-A ; VII-A, B ; Fig. 1A_2 à G_2).

2. La pigmentation.

L'aspect granuleux de la spore résulte de sa pigmentation qui affecte essentiellement la masse interne de chacune des loupes et de façon moins intense et, plus tardive, la substance fondamentale qui entoure celle-ci ainsi que la couche castor de la paroi intermédiaire (Fig. 1G_2).

Les premières traces de pigmentation apparaissent d'abord de façon dispersée dans la masse interne des loupes, sous forme de petits grains très fins bien réactifs au test de Thiéry (Pl.VII-A ; Fig. 1E_2).

Plus tard (Pl.VII-B), des granules de pigmentation plus gros se forment dans la masse interne des loupes. Ils sont constitués d'une masse amorphe peu réactive contenant un nombre réduit de petits grains fortement Patag + . Ces granules peuvent, çà et là, être plus ou moins fusionnés en bâtonnets sinueux, surtout vers la périphérie de la masse interne (Pl.VII-B, VIII-A ; Fig. 1F_2). Dans les lambeaux de substance fondamentale de la loupe apparaissent alors de petits grains très fins, dispersés, moins réactifs que ceux des granules (Pl.VII-B). Ultérieurement, les bâtonnets sinueux de la périphérie de la masse interne de la loupe deviennent plus nombreux, se soudent plus ou moins les uns aux autres et forment ainsi une sorte de mince croûte irrégulière autour de cette masse (Pl.VIII-B).

Quand la spore est mûre (Pl.VIII-C ; Fig.1G_2), la densité et la réactivité de la masse interne des loupes sont renforcées par des sortes de cannelures qui résultent probablement de la fusion de nombreux bâtonnets sinueux mentionnés plus haut. Ces cannelures irrégulières, rapprochées, très réactives, sont plus ou moins parallèles et disposées un peu obliquement par rapport au plan équatorial de la spore. La partie centrale de la masse interne des loupes peut être dépourvue de cannelures (Pl.VII-C) et présenter alors un aspect grisâtre assez uniforme. Au cours de la maturation, la substance fondamentale de la loupe continue à se charger de pigment, et, par suite, son aspect devient alors analogue à celui que présentait, au début, la masse interne ; elle ne semble pas être pigmentée davantage quand la spore est mûre. La couche castor se charge peu à peu de pigment et à la fin devient très dense et très réactive.

3. La structure de la périspore.

La périspore des ascospores granuleuses (Pl.VI-A, E ; Fig. 1D_2) a une structure analogue à celle des ascospores albinos (gène b_8). Elle contient des vésicules dont les plus externes, qui sont plus grosses, semblent aussi pouvoir se déverser à la surface de la spore. Certaines de ces grosses vésicules peuvent contenir des granules de pigmentation (Pl.VII-B).

4. Surface sporale.

Elle rappelle celle des ascospores albinos (gène b_8) aux stades jeunes (Pl.V-A ; Fig. 1A_2) comme aux stades plus âgés. Lors de ceux-ci, on y observe aussi des extrusions en forme de « chapelets de saucisses » parfois plus spectaculaires encore que celles du mutant albinos (Pl.VI-C, D ; Fig. 1D_2 à F_2). La surface de la spore mûre est aussi très irrégulière (PL.VII-A ; Fig. 1G_2).

5. Paroi intermédiaire.

Aux jeunes stades du développement (Pl.V-B, C, D ; Fig.1B_2, C_2), la base de la périspore est renforcée d'une mince couche basale lamellaire très réactive au test de Thiéry (mais non réactive au citrate ; Pl.V-F) qui recouvre la couche blanche de la paroi intermédiaire sur toute la surface de la spore.

Un peu plus tard, une très mince couche claire, Patag —, apparaît à l'extérieur de la couche basale (Pl.VI-A ; Fig. 1D_2) et cela sur toute la surface de la spore ; son épaisseur d'abord irrégulière surtout sous les loupes, s'uniformise ensuite. La couche basale réactive se trouve ainsi placée dans la position de la lamelle noire observée chez les ascospores de la lignée sauvage, au milieu de la couche blanche de la paroi intermédiaire.

Plus tard, lorsque les grains fins de pigmentation commencent à se déposer (Pl.VII-A ; Fig. 1E2), la lamelle noire perd sa réactivité en dehors des loupes. Bientôt elle ne forme plus sous celles-ci que de très courtes striations transversales, fines et contiguës (Patag+) (Pl.VII-B ; Fig. 1F2) et elle s'efface plus ou moins complètement sur le reste de la surface sporale. Quand les spores sont mûres, la lamelle noire n'est plus distincte (Pl.VIII-C ; Fig. 1G2).

6. Les globules lipidiques du sporoplasme.

Ces globules (Pl.V-E, VI-B) ont un aspect analogue à ceux de la lignée sauvage ; à la périphérie, ils sont un peu plus granuleux que ceux du mutant albinos (gène b8).

En dehors de la pigmentation des loupes, les différences ultrastructurales entre le mutant granuleux (gène b8) et le mutant albinos (gène b8) sont faibles : chez les deux mutants la structure de la périspore est analogue, la surface sporale présente également des extrusions bien marquées, les différences dans l'aspect des globules lipidiques du sporoplasme et dans la paroi intermédiaire de la partie profonde sont légères.

CONCLUSION

Il est remarquable que la mise en place du caractère albinos portant sur le gène b8 s'accompagne de l'établissement d'un caractère propre au mutant granuleux (limitation de la périspore interne à des loupes séparées) et que les caractères ultrastructuraux distinctifs du mutant albinos soient des modulations de ceux du mutant granuleux, le mutant albinos étant en quelque sorte une expression extrême du mutant granuleux.

Pour comparer utilement les albinos b2 et b8, il convient donc de faire abstraction chez ce dernier des caractères propres au mutant granuleux, pigmentation mise à part. Alors il apparaît que les modifications qui, chez ces deux mutants, accompagnent l'absence de pigment sont relativement discrètes et en nombre réduit : structure et localisation (vacuolaire ou non) des globules lipidiques du sporoplasme, détails de l'organisation de la paroi intermédiaire de l'ascospore (mince couche réactive externe et lamelle noire), importance relative des irrégularités de la surface sporale.

Parmi ces caractères, ce sont ceux des globules lipidiques qui sont les premiers perceptibles au cours du développement ; leur particularité est même affirmée avant la formation des loupes chez les albinos b8.

L'expression du caractère albinos est donc directement en relation avec le métabolisme lipidique de la spore. La modification de celui-ci semble perturber les échanges entre la spore et l'épiplasme de l'asque car, non seulement la surface sporale est affectée, mais aussi la paroi intermédiaire dont on a déjà suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de ces échanges (loc. cit.).

La voie vers l'absence de pigment s'établit donc assez précocement mais semble être indépendante ou avoir des rapports très lâches avec la voie menant à l'édification de la structure de type granuleux puisque celle-ci peut s'établir au cours du développement de l'albinos b8.

L'étude de doubles mutants, soit entièrement albinos à la fois sur le gène b2 et sur le gène b8, soit albinos pour b2 et granuleux sur b8, pourrait se révéler intéressante en permettant une analyse plus fine des conditions d'expression du caractère albinos.

REMERCIEMENTS

Nous avons plaisir à remercier pour leur assistance technique H., CHACUN et M.-C. MALHERBE pour les coupes ultrafines, M. LETALNET et E. VAST pour les photographies, T. CASSES pour les dessins, E. VADE pour la frappe du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

BELLEMÈRE A., MELENDEZ-HOWELL L.M., NICOLAS A. et ROSSIGNOL J.-L., 1981 — Etude ultrastructurale comparative du développement des ascospores chez la lignée sauvage et chez des mutants à ascospores « ceinturées » ou « albinos » de l'*Ascobolus immersus* Pers. ex. Fr. *Cryptogamie, Mycol.* 2 : 299-359.

NICOLAS A., ARNAISE S., HAEDENS V. and ROSSIGNOL J.-L., 1981 — Ascospore mutants and genetic map of *Ascobolus immersus* stock 28. *J. Gen. Microbiol.* 125 : 257-272.

ABRÉVIATIONS DES LÉGENDES DES PLANCHES

b	bâtonnets de pigment
bl	couche blanche
ca	cannelure
cb	couche basale sombre sous les loupes
cc	couche « castor »
cl	couche claire à la base d'une loupe
cp	couche « pollux »
cr	croûte pigmentée
d	dépôts
e	épiplasme
ex	extrusion de la surface sporale
g	glycogène
gf	grains fins de pigment
gl	globules lipidiques
gr	granules de pigment
l	loupe
la	lambeaux persistant de substance originelle de la loupe
le	limitante externe
ln	lamelle noire
m	mitochondrie
mi	masse interne de la loupe
p	périspore
pa	paroi de l'asque
pc	partie centrale de la masse interne
pe	périspore externe
pg	petits grains de pigments
pi	paroi intermédiaire
pl	plasmalemme
pm	périspore moyenne
pp	paroi propre de la spore
so	substance fondamentale originale de la loupe
sp	sporoplasme
spp	sporoplasme périphérique
v	vacuole
vp	vésicule de la périspore
ze	zone externe de la loupe

ABBREVIATIONS IN PLATES

b	rodlet of pigment
bl	white sheath
ca	fluting
cb	dark basal layer under the lens
cc	« castor » layer
cl	clear layer at the basis of a lens
cp	« pollux » layer
cr	pigmented crust
d	deposits
e	epiplasm
ex	extruded part on the spore surface
g	glycogen
gf	small granules of pigment
gl	lipid bodies
gr	big granules of pigment
l	lens
la	persisting shreds of original lens substance
le	investing membrane
ln	black sheath
m	mitochrondria
mi	internal part of the lens
p	perispore
pa	ascus wall
pc	central body of the internal part
pe	external perispore
pg	small granules of pigment
pi	intermediate wall
pl	plasmalemma
pm	median perispore
pp	proper wall of the spore
so	original fundamental substance of the lens
sp	sporoplasm
spp	external sporoplasm
v	vacuole
vp	perispore vesicle
ze	external part of the lens

Planche I — *Abscobolus immersus*, mutant albinos (gène bs). — A. Contact sinueux entre une jeune ascospore et l'épiplasme (Patag). — B. Jeune ascopore encore dépourvue de loupes (Patag). Remarquer les globules lipidiques dans des aires claires du sporoplasme (flèches) (cf. aussi ID). — C. Loupe bien développée dans la périspore moyenne (pm) d'une jeune ascospore (Patag). — D. Même ascospore que IB (Patag). Les globules lipidiques (gl) sont inclus dans des structures vacuolaires (flèches). — E. Détail de la paroi intermédiaire d'une ascospore un peu plus âgée que IC (Patag). La couche castor (cc) est mince, la couche pollux, sous-jacente, n'est pas encore clairement distincte.

Plate I — *Abscobolus immersus*, albino mutant (bs gene). — A. Meandering contact between a young ascospore and epiplasm (Patag). — B. Young ascospore still without lens (Patag). Note the lipid bodies in clear areas of epiplasm (arrows) (cf. also ID). — C.Well developed lens in the median perispore (pm) in a young ascospore (Patag). — D. The same ascospore as IB (Patag). Lipid bodies are included in vacuolar structures (arrows). — E. Detail of the intermediate wall in a ascospore somewhat older than IC (Patag). Castor layer (cc) is thin, the underneath pollux layer is not yet clearly distinct.

Planche II — *Abscobolus immersus*, mutant albinos (gène bs). — A. Ascospore séparée de l'épiplasme par une large vacuole. Dans une loupe de la périspore une masse interne (mi) se développe (Patag). — B. Présence de nombreuses petites vésicules dans la périspore (Patag). — C. La périspore contient de petites vésicules dans sa partie profonde et des vésicules plus volumineuses près de sa surface où l'on observe quelques extrusions. La loupe est presque complètement envahie par la masse interne (mi) (Patag). — D. Des dépôts réactifs (d) sont présents dans la vacuole de l'épiplasme (v) et à la surface de l'ascospsore. La masse interne de la loupe est importante (Patag).

Plate II — *Abscobolus immersus*, albino mutant (bs gene). — A. The ascospore is separated from epiplasm by a big vacuole. In a perisporal lens an internal part (mi) is developing (Patag). — B. Numerous small vesicles are present in the perispore (Patag). — C. In the internal part of the perispore the vesicles are small ; they are bigger near its surface ; this shows some extrusions. The lens is nearly quite invaded by the internal part (mi) (Patag). — D. Reactive deposits (d) are present in epiplasmic vacuoles (v) and on the ascospore surface. The internal part of lens is important (Patag).

Planche III — *Abscobolus immersus*, mutant albinos (gène bs). — A. Détail de la paroi d'une ascospore au niveau de sa paroi intermédiaire, au-dessous d'une loupe (Patag). La mince couche de périspore qui se trouve sous la loupe est bien distincte. Une très mince couche réactive (flèche) limite la base de la périspore à ce stade (flèche). — B. Détail de la paroi d'une ascospore au niveau de sa paroi intermédiaire (Patag). En dehors de la loupe la couche blanche (bl) est plus épaisse que sous la loupe et paraît dédoublée (double flèche). — C. Dépôts réactifs (d) dans une vacuole de l'épiplasme et au contact entre celle-ci et le cytoplasme de l'asque (Patag). — D. Surface d'une ascospore en cours de maturation (Patag). Noter l'abondance de vésicules assez volumineuses à contenu réactif (vp). L'aspect de la surface sporale (triple flèche) suggère l'exocytose de ces vésicules.

Plate III — *Ascobolus immersus*, albino mutant (bs gene). — A. Detail of an ascospore wall at the intermediate wall level, under a lens (Patag). The thin perispore sheath under the lens is quite distinct. At this stage a very thin reactive layer (arrow) limits the perispore basis (arrow). — B. Detail of ascospore wall at its intermediate wall level (Patag). Out of the lens the white sheath (bl) is thicker than under the lens and it seems made of two parts (double arrow). — C. Reactive deposits in an epiplasmic vacuole at its contact with the ascus cytoplasm (Patag). — D. Surface of a maturing ascospore (Patag). Note numerous well-developed vesicles with a reactive content (vp). Exocytose of these vesicles is suggested by the character of ascospore surface (tripple arrow).

Planche IV — *Ascobolus immersus*, mutant albinos (gène bs). — A. Ascospore proche de la maturité (Patag). La zone externe de la loupe (ze) est dilatée au niveau des lambeaux de substance fondamentale (la). Sous la masse interne réactive de la loupe une mince couche claire apparaît (flèche). — B. Paroi d'une ascospore proche de la maturité (Patag). La périspore contient de petites vésicules internes d'aspect clair. Le contenu d'une vésicule externe volumineuse est différencié. — C, D. Détails de la surface d'une ascospore proche de la maturité (Patag). La surface comporte des extrusions (ex) couvertes de dépôts

(d). Dans la périspore les vésicules (vp) ont un contenu différencié dont l'aspect rappelle celui des loupes. — E. Détail du sporoplasme d'une ascospore mûre (Patag). Le plasmalemme (pl) forme de nombreuses indentations (double flèche) ; le sporoplasme périphérique, clair, est dépourvu d'organites ; dans les mitochondries (m), qui ont perdu leur réactivité, les crêtes sont presque effacées.

Plate IV — *Ascobolus immersus*, albino mutant (b8 gene). — A. Ascospore nearly mature (Patag). The external part of the lens (ze) is expanded where shreds of fundamental substance (la) are present. A thin clear layer is present under the reactive internal part of the lens (arrow). — B. Wall of a nearly mature ascospore (Patag). Small clear vesicles are contented in the perispore. An external voluminous vesicle has a differenciated content. — C, D. Details of the surface of a nearly mature ascospore (Patag). There are extrusions (ex) with deposits (d) on its surface. Vesicles (vp) in the perispore have a differentiated content which looks like the lens content. — E. Detail of the sporoplasme of a mature ascospore (Patag). Numerous indentations (double arrow) are seen on the plasmalemma (pl). No organelles are present in the clear external part of the sporoplasm ; mitochondria are not reactive, their crests have quite dissappeared.

Planche V — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène b8). — A. Paroi d'une jeune ascospore (Patag). Le contact entre la périspore (p) et l'épiplasme (e) est très sinueux. La paroi intermédiaire n'est pas encore distincte. B. Jeune ascospore avec une loupe (l) à la base de la périspore (Patag). La paroi intermédiaire, bien distincte, est complexe (cf. VC). — C. Détail de VB (Patag). Dans la paroi intermédiaire la zonation de la couche castor est très apparente. — D. Développement d'une masse interne dans une loupe de la périspore d'une ascospore assez jeune (Patag). — E. Détail du sporoplasme d'une jeune ascospore (Patag) (cf. ID). — F. Loupe de la périspore d'une ascospore assez jeune (acétate d'uranyle, citrate de plomb).

Plate V — *Ascobolus immersus*, granular mutant (b8 gene). — A. Wall of a young ascospore (Patag). The contact between the perispore (p) and the epiplasm (e) is meandered. The intermediate wall is not yet distinct. — B. Young ascospore with a lens (l) in the perispore basis (Patag). The intermediate wall is quite distinct and complex (cf. VC). — C. Detail of VB (Patag). The castor layer is clearly underlayered. — D. An internal part is developing in a perisporal lens of a young ascospore (Patag). — E. Detail of the sporoplasm of a young ascospore (Patag). (cf. ID). — F. Lens in the perispore of a rather young ascospore (uranyl acetate, lead citrate).

Planche VI — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène b8). — A. Paroi d'une ascospore en cours de maturation (Patag). Dans la loupe de la périspore la masse interne (mi) est devenue très importante. Hors de la loupe la périspore contient de petites vésicules internes, claires, et des vésicules externes, plus grosses, à contenu réactif. La surface sporale est irrégulière. — B. Détail du sporoplasme d'une ascospore en maturation (Patag). (cf. IVE). — C. Détail de la surface d'une ascospore (Patag). Noter les extrusions irrégulières (ex) et les dépôts réactifs (d). — D. Détail de la surface d'une ascospore (acétate d'uranyle, citrate de plomb). Les extrusions filiformes (ex) portent des dépôts très réactifs disposés comme des chapelets de saucisses. — E. Détail de la périspore d'une ascospore (acétate d'uranyle, citrate de plomb). La périspore moyenne, claire, contient des vésicules (vp) un peu opaques.

Plate VI — *Ascobolus immersus*, granular mutant (b8 gene). — A. Wall of a maturing ascospore (Patag). The internal part (mi) of perispore lens is now very important. Out of the lens there are small internal vesicles and bigger reactive external vesicles in the perispore. The ascospore surface is irregular. — B. Detail of the sporoplasm of a maturing ascospore (Patag) (cf. IVE). — C. Detail of an ascospore surface (Patag). Note irregular extrusions (ex) and reactive deposits (d). — D. Detail of an ascospore surface (uranyl acetate, lead citrate). Thread-like extrusions (ex) bear very reactive deposits remending beads of saussages. — E. Detail of the perispore of an ascospore (uranyl acetate, lead citrate). The clear median perispore contents rather dark vesicles (vp).

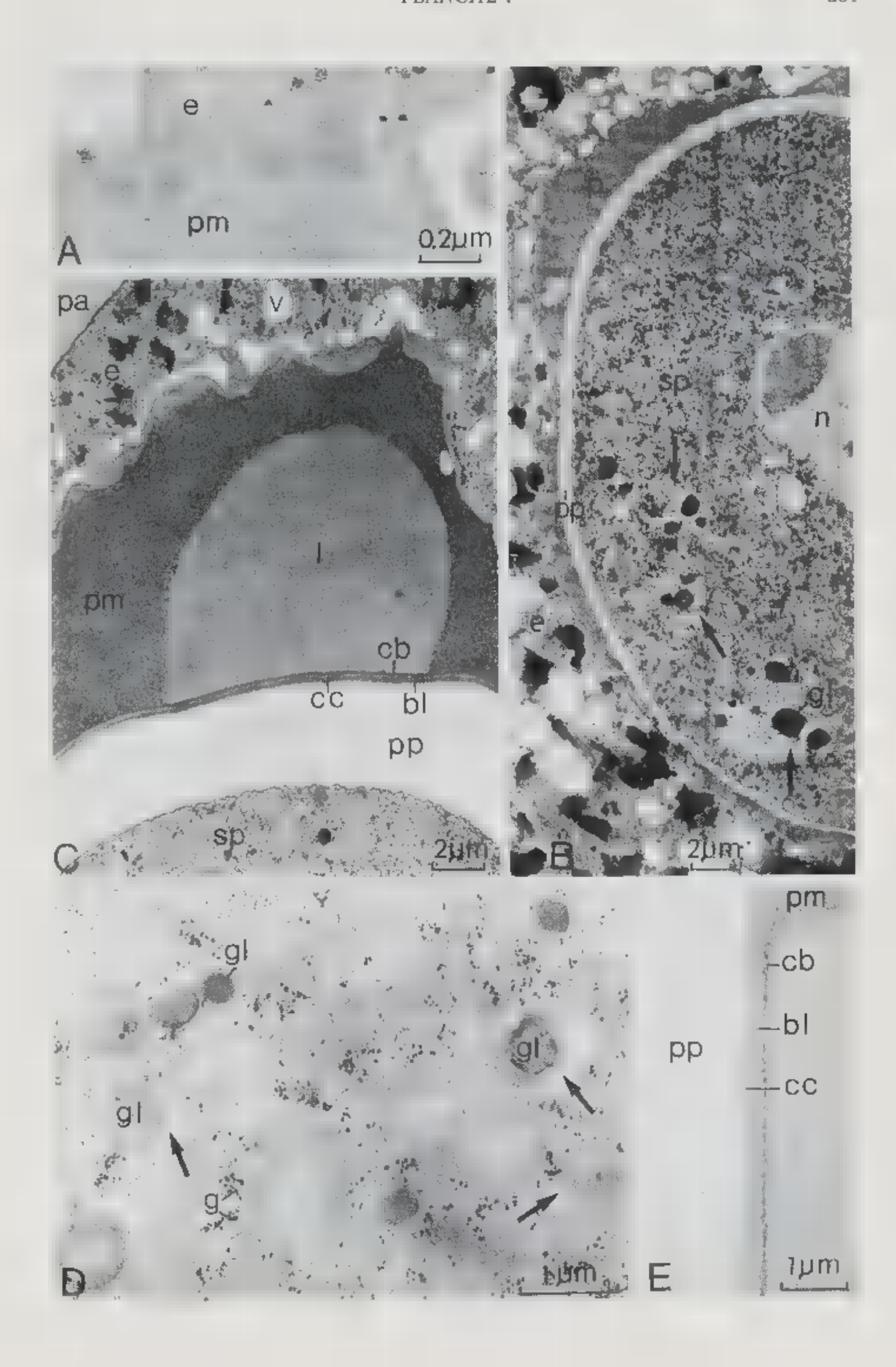
Planche VII — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène b8). — A. Détail de la paroi d'une ascospore en début de pigmentation (Patag). La masse interne d'une loupe de la périspore contient de nombreux grains de pigment, très fins (gf) alors qu'il y en a très

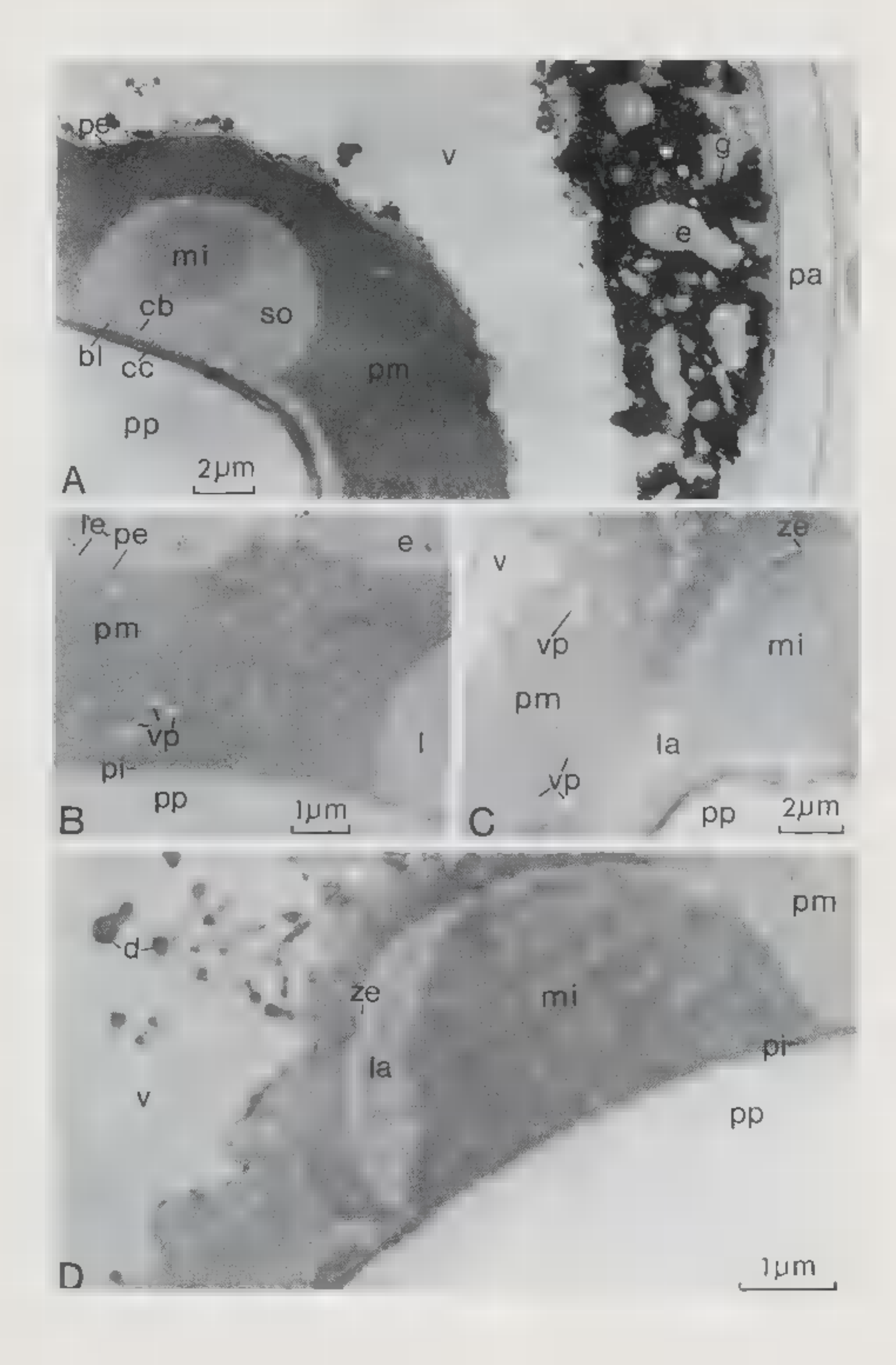
peu dans le lambeau de substance fondamentale (la). La couche castor (cc) et la couche pollux se pigmentent aussi. La lamelle noire (ln) est bien réactive sous la loupe mais n'est pas distincte ailleurs (flèche). — B. Détail du bord d'une loupe de la périspore d'une ascospore en cours de pigmentation (Patag). Dans la masse interne de la loupe les fins grains de pigment sont portés par des granules (gr) coalescents en une croûte vers la périphérie. Le lambeau de substance fondamentale de la loupe (la) contient de nombreux grains fins de pigment qui sont dispersés. La couche castor (cc) est bien pigmentée.

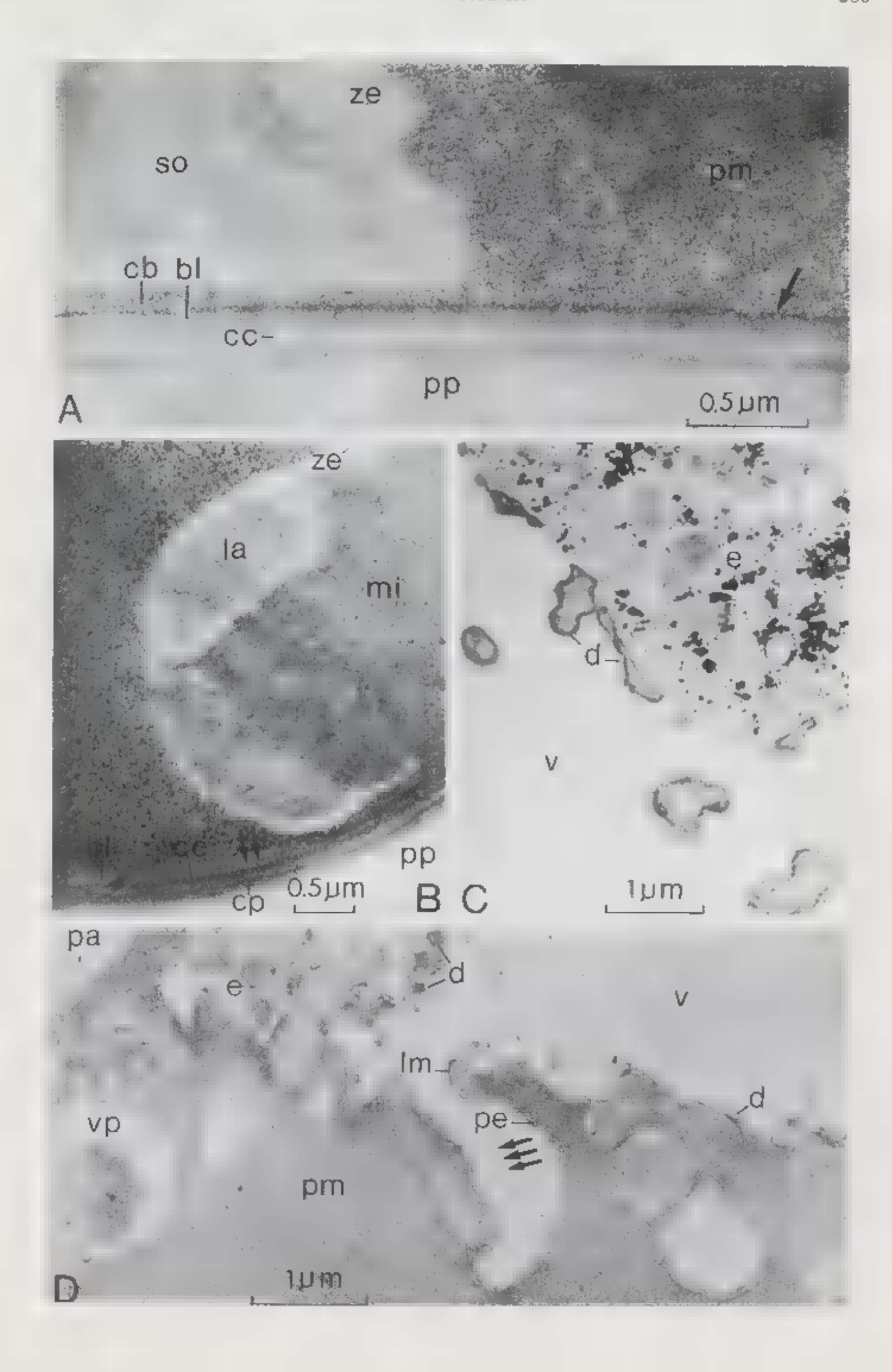
Plate VII — *Ascobolus immersus*, granular mutant (b8 gene). — A. Detail of the ascospore wall in an early stage of pigmentation (Patag). The internal part of a perispore lens contents many pigmented, very thin granules (gf) ; those are rather scarce in the shread of fundamental substance (la). Castor layer (cc) and pollux layer are also pigmented. The black sheath (ln) well reactive under the lens is not elsewhere distinct (arrow). — B. Detail of the border of a perispore lens in a pigmenting ascospore (Patag). The thin pigmented granules of the internal part of a lens are born on big granules (gr) which at the periphery, are fusing in a crust. In the shread of fundamental substance of the lens (la) there are numerous scattered thin pigmented granules. The castor layer (cc) is well pigmented.

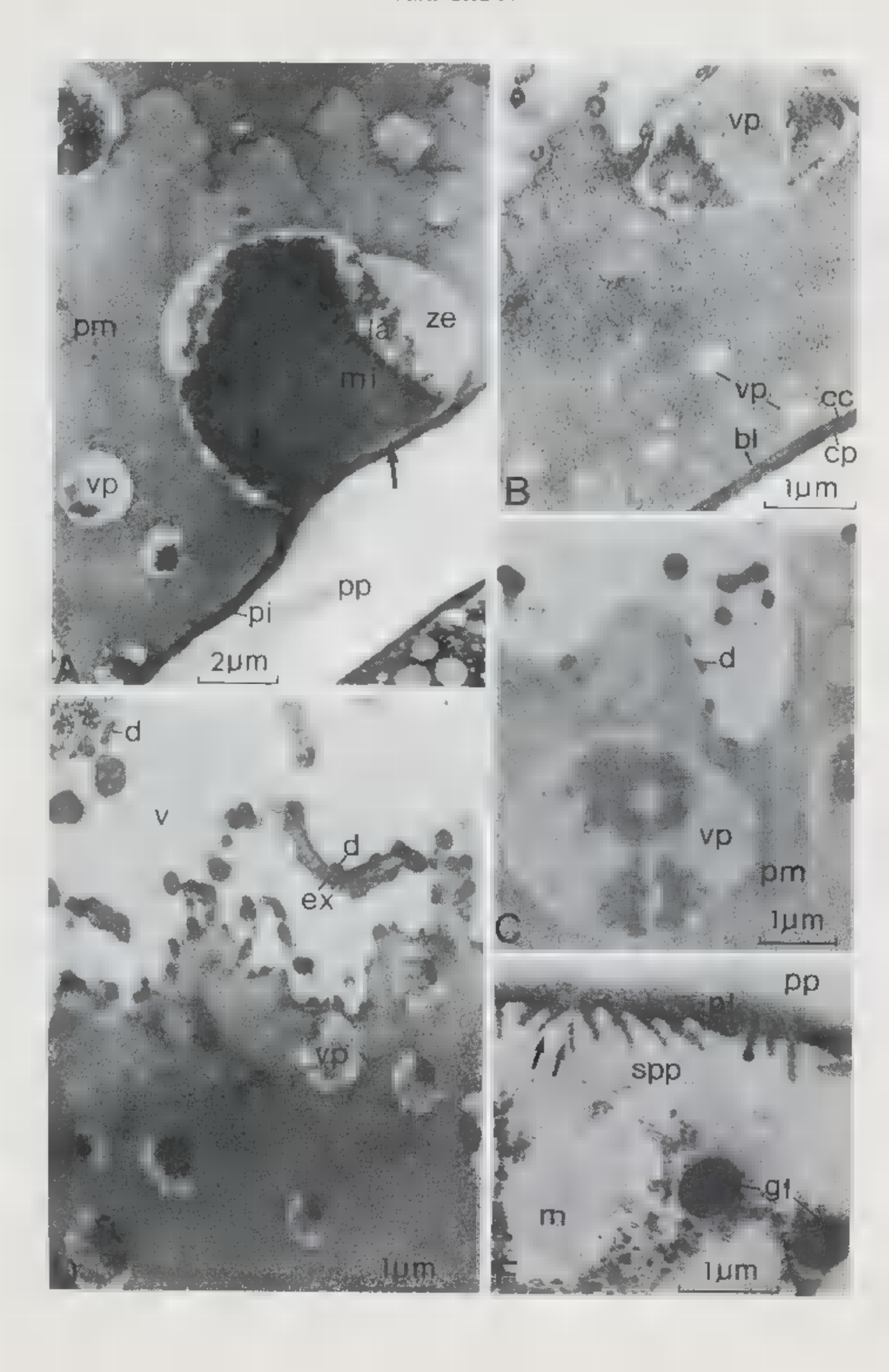
Planche VIII — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène b8). — A. Détail d'une loupe de la périspore d'une ascospore en cours de pigmentation (acétate d'uranyle, citrate de plomb). La technique de contraste ne fait apparaître que de courts bâtonnets de pigment à la périphérie de la masse interne de la loupe. — B. Détail de la périspore surmontant une loupe dans une ascospore en cours de pigmentation (Patag). Une vésicule volumineuse de la périspore (vp) contient des granules de pigment (gr). Dans la loupe la zone externe n'est pas pigmentée ; la masse interne montre des grains très fins portés par des granules qui, à la périphérie, sont associés en une sorte de croûte (cr). — C. Périspore avec loupe dans une ascospore mûre (Patag). Dans la masse interne de la loupe le pigment forme des cannelures (ca) très réactives ; celles-ci font défaut dans sa partie centrale (pc). Dans le lambeau de substance fondamentale (la) le pigment forme des granules (gr) ou des bâtonnets (b). La périspore elle-même n'est pas pigmentée, sa surface externe est très irrégulière. — D. Détail de VIIIC (Patag) : contact entre les cannelures de pigment (ca) de la masse interne de la loupe et les bâtonnets (b) et les granules (gr) de pigment d'un lambeau de substance fondamentale (la) de la loupe.

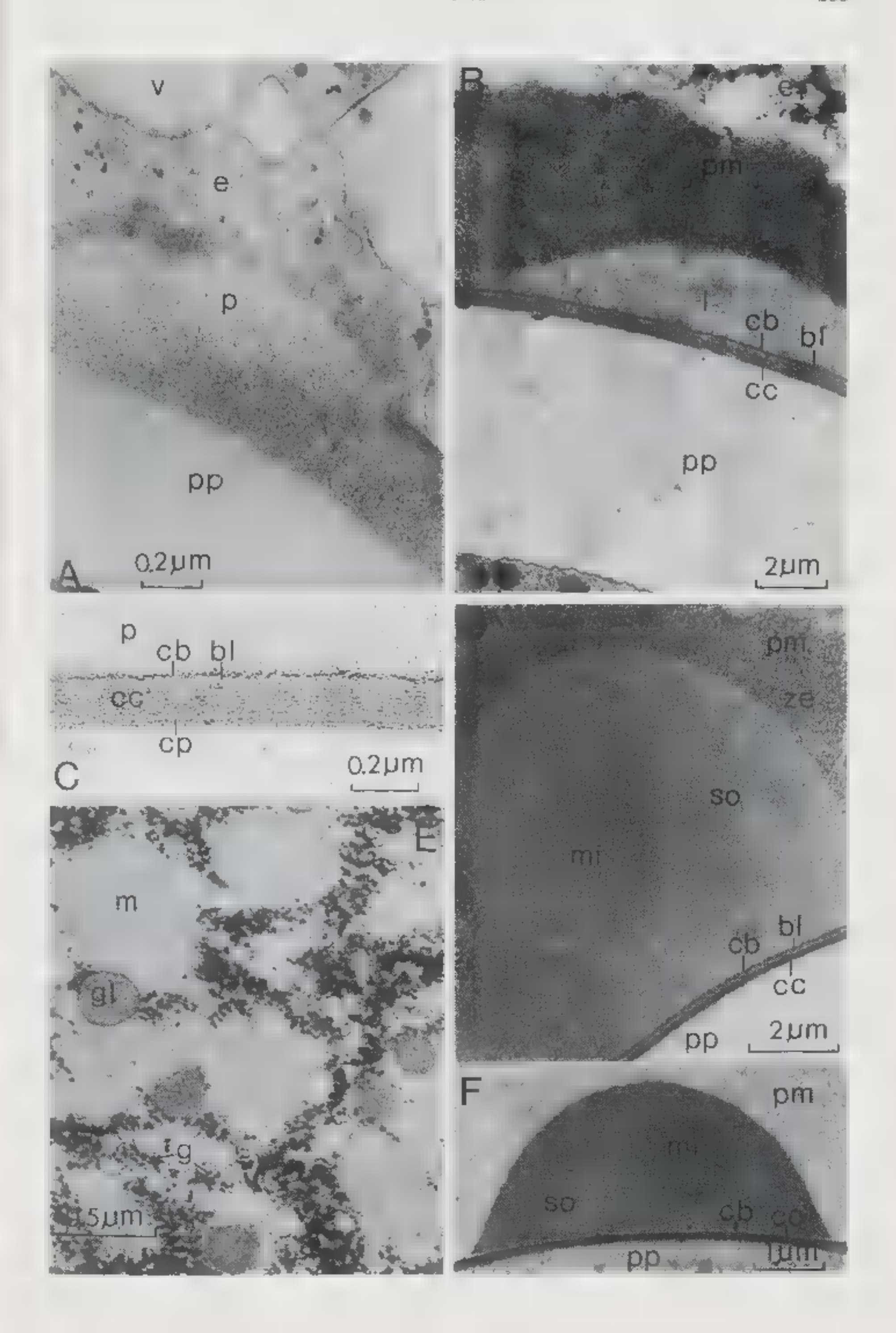
Plate VIII — *Ascobolus immersus*, granular mutant (b8 gene). — A. Detail of a perispore lens in a pigmenting ascopore (uranyl acetate, lead citrate). Only short rods of pigment appeared contrasted in the periphery of the internal part of the lens. — B. Detail of the perispore over a lens in a pigmenting ascospore (Patag). The perispore shows a big vesicle (vp) with pigmented granules (gr). The external part of the lens is unpigmented ; in the internal part very thin granules are born on bigger granules which at the periphery are fused in a sort of crust (cr). — C. Perispore with lens in a mature ascospore (Patag). In the internal part of the lens the pigment is disposed in reactive flutings (ca) ; these lack in the central part (pc). In the shread of fundamental substance the pigment is disposed either in granules (gr) or rodlets (b). The perispore is not pigmented ; its external surface is very irregular. — D. Detail of VIIIC (Patag) : contact between the pigmented flutings (ca) of the internal part of the lens with the rodlets (b) and the granules of pigment pertaining to a shread of fundamental substance of the lens (la).

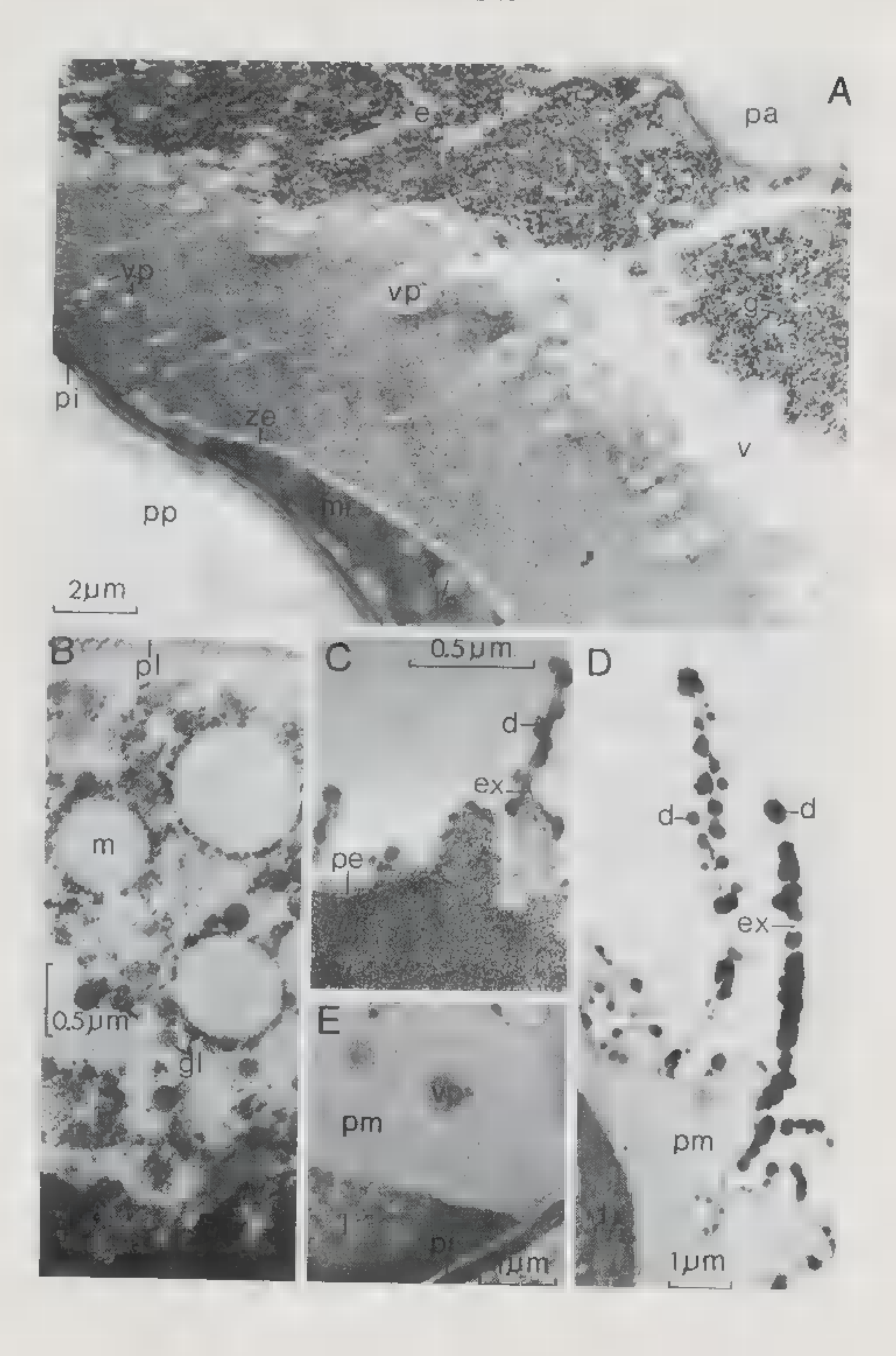

e
pm
0.2µm
A
pa
v
e
pm
l
cb
cc
bl
pp
sp
2µm
C
sp
n
pp
e
gl
B
2µm
gl
gl
gl
g
1µm
D
pp
pm
cb
bl
cc
E
1µm

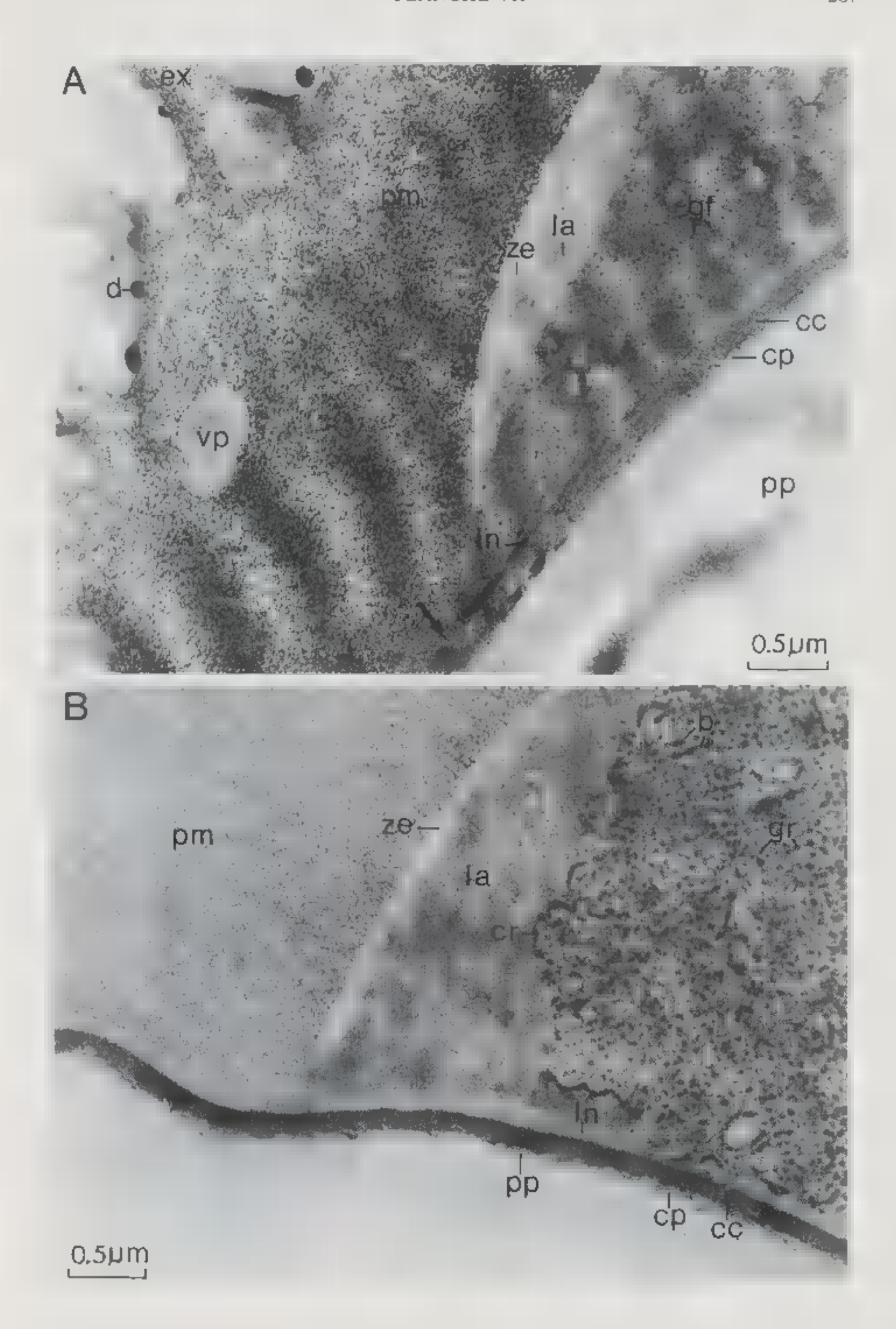

pe
v
g
e
pa
mi
cb
so
bl
cc
pm
pp
A
2µm
fe
pe
e
pm
vp
pi
pp
l
B
1µm
ze
v
vp
mi
pm
la
vp
pp
C
2µm
pm
d
ze
mi
la
pi
v
pp
D
1µm

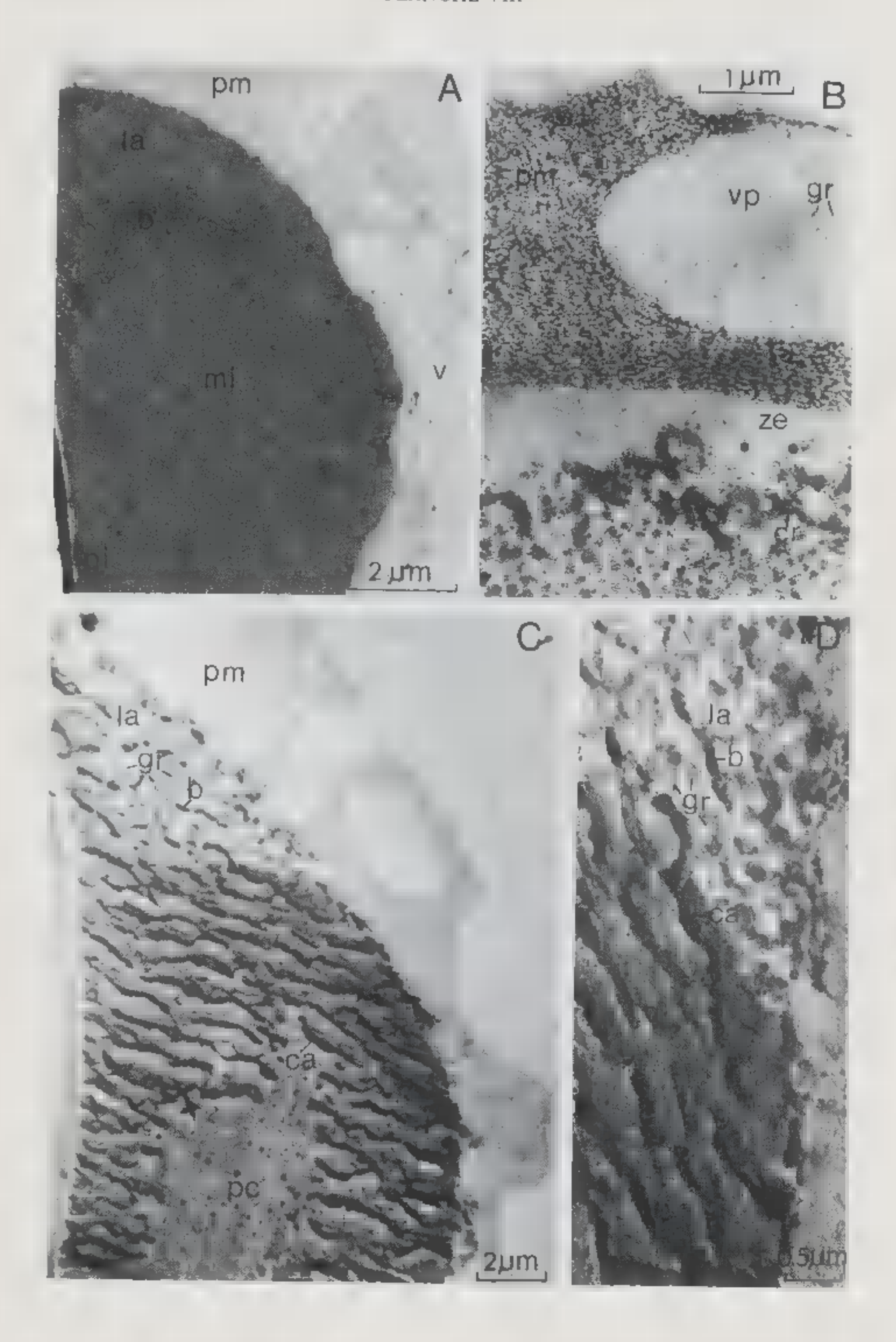

ze
so
pm
cb bl
cc
pp
A
0.5 µm
ze
la
mi
e
d
v
cc
pp
cp
0.5µm
B C
1µm
pa
e
d
v
lm
d
pe
vp
pm
D
1µm


pm
la
ze
mi
vp
pp
pi
2µm
A
vp
vp
cc
bl
cp
B
1µm
d
v
d
ex
vp
1µm
d
vp
pm
C
1µm
pp
pi
spp
gt
m
1µm


v
e
p
pp
A
0,2µm
B
e
pm
l
cb
bl
cc
pp
2µm
p
cb
bl
cc
cp
C
0,2µm
E
m
gl
g
pm
ze
so
mi
bl
cb
cc
pp
2µm
F
pm
mi
so
cb
pp


A
e
pa
vp
vp
g
pi
ze
v
pp
mr
2µm
B
pl
m
0.5µm
gl
C
0.5µm
d
ex
pe
E
pm
vp
pi
1µm
D
d
d
ex
pm
1µm


A
ex
d
pm
la
ze
gf
cc
cp
vp
pp
ln
0.5µm
B
b
pm
ze
gr
la
cr
ln
pp
cp
cc
0.5µm


A
pm
la
b
ml
v
2 µm
B
1 µm
pm
vp
gr
ze
cr
C
pm
la
gr
b
ca
pc
2µm
D
la
b
gr
ca
0,5µm